

Aus dem Pathologischen Institut (Direktor: Prof. Dr. H. MEESSEN) und dem Institut für Bakteriologie und Hygiene (Direktor: Prof. Dr. W. KIKUTH) der Medizinischen Akademie Düsseldorf

## **Nachweis komplementbindender Strukturen in Aschoffschen Knötchen operativ entfernter Herzohren\***

Von

**KLAUS KÜPPER, ERICH LANGER und PAUL KLEIN**

Mit 3 Textabbildungen

*(Eingegangen am 12. April 1961)*

Nachdem ASCHOFF (1904) und GEIPEL (1960) die nach ihnen benannten Zellknötchen als gewebliches Kennzeichen des Rheumatismus in allen Schichten der Herzwand beschrieben hatten, erkannte KLINGE (2) in diesen Granulomen nur das gestaltliche Merkmal einer bestimmten Phase im Ablauf des rheumatischen Gewebsschadens, der mit der fibrinoiden Verquellung des Bindegewebes beginnt und mit der Narbe endet. Die Ansichten über die Bildung dieser Aschoff-Geipel-schen Knötchen verknüpft sich mit den Vorstellungen von der Ätiologie des Rheumatismus. Außer der von klinischer Seite hervorgehobenen Disposition haben LANCEFIELD, COBURN und YOUNG in der Mehrzahl der Fälle von rheumatischem Fieber die wesentliche Bedeutung der Infektion mit „A“-Streptokokken in der ersten Phase der Erkrankung belegt und auf die antigene Wirkung dieser Erreger hingewiesen. In der zweiten Phase solle der Organismus durch die antigenen Eigenschaften dieser „A“-Streptokokken, möglicherweise auch durch die antigenen Eigenschaften körpereigener Stoffe, sensibilisiert werden, so daß schließlich der rheumatische Gewebsschaden eine hyperergische Entzündung darstelle. Diese Auffassung wurde besonders durch die experimentellen Untersuchungen auf dem Gebiete der Allergieforschung von RÖSSLE, SWIFT und KLINGE eingeleitet und wesentlich unterbaut; auch neuere Untersuchungen von KAPLAN und DALLENBACH weisen in diese Richtung.

Diese Vorstellung von der Entstehung des rheumatischen Gewebsschadens lenkt den Morphologen auf die Frage nach Substanzen in den Aschoffschen Knötchen, die entweder Antigen-Antikörper-Komplexe (Ag-Ak-Komplexe) sind oder sich wie solche verhalten.

Wir haben unsere Untersuchungen auf die Beantwortung dieser Frage abgestellt. Dabei wendeten wir die Methoden der Immunhistologie an, die im Prinzip zuerst OBERMAYER und PRICK (1906) einführten und die dann COONS und seine Mitarbeiter erneut aufnahmen aber grundsätzlich erweiterten.

### **Material und Methode**

Als Untersuchungsobjekt wählten wir die Herzohren von 48 Patienten, die wegen einer Mitralklappenstenose operiert worden waren, und für die Kontrollen Herzohren von 12 Patienten, bei denen wegen eines kongenitalen Herzfehlers ein operativer Eingriff erforderlich gewesen

\* Die Befunde wurden auf der Tagung der Arbeitsgemeinschaft rheinisch-westfälischer Pathologen in Bonn am 16. 7. 1960 von LANGER und KÜPPER vorgetragen.

war. Zum Nachweis von Ag-Ak-Komplexen oder sich gleichartig verhaltender Substanzen benutzten wir das Verfahren nach KLEIN und BURKHOLDER, mit dem im Modellversuch, im Gegensatz zur Methode von COONS, Ag-Ak-Komplexe durch Komplementbindung als Ganzes erfaßt und durch ein mit Fluorescein gekoppeltes Antikomplement fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden können.

Die Herzohren wurden unmittelbar oder höchstens bis 30 min nach ihrer operativen Entfernung untersucht. Von jedem Herzohr stellten wir im Kryostaten eine Serie von sieben nativen bis  $5\mu$  dicken Schnitten her. Der erste Schnitt wurde zunächst mit Komplement (Meerschweinenserum) überschichtet, nach entsprechender Einwirkungszeit abgespült, dann mit fluoresceingekoppeltem Antikomplement bedeckt und anschließend nach erneutem Abspülen mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Den zweiten Schnitt und nach abgeschlossener fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung auch den ersten Schnitt der Serie färbten wir zur Feststellung von Zahl und Lage der Aschoffschen Knötchen mit Hämalaun-Eosin. Die übrigen Schnitte behandelten wir zur Kontrolle der gelungenen Komplementbindung im gleichen Arbeitsvorgang mit verschiedenartig inaktiviertem Komplement (Hitze, Decalcifikation, Dekomplementation durch Erschöpfung mit Ag-Ak-Komplexen). Die Empfindlichkeit des immunhistologischen Untersuchungssystems kontrollierten wir laufend an einem mit *B. proteus* und Anti-*B. proteus* hergestellten Ag-Ak-Komplex (methodische Einzelheiten bei KLEIN und BURKHOLDER, CRAMER und LANGER).

Der positive Ausfall dieser Komplementbindungsreaktion im Gewebsschnitt ist an drei Voraussetzungen gebunden: 1. Die für das Fluorescein charakteristische leuchtend hellgrüne, deshalb manchmal auch als „spezifisch“ bezeichnete Fluoreszenz muß strukturgebunden sein. 2. Diese Fluoreszenz muß gegen die Eigenfluoreszenz des Gewebes und gegen eine gelegentlich auftretende schwache diffuse Fluoreszenz, die durch die Behandlung mit Antikomplement ausgelöst werden kann, eindeutig kontrastieren. 3. Die charakteristische oder „spezifische“ strukturgebundene Fluoreszenz ist durch das Ausbleiben der Fluoreszenz in den mit inaktiviertem Komplement behandelten Kontrollschnitten zu belegen; sie müssen durch ihren negativen Ausfall zeigen, daß die Anlagerung des mit Antikomplement darstellbaren Materials unter Bedingungen erfolgt, die für die Reaktion zwischen Ag-Ak-Komplexen und Komplement charakteristisch sind.

Tabelle

Herzohren	Zahl der Fälle		Charakteristische Fluoreszenz			
			RK	EE	EB	GE
Mitralstenose	48					
mit RK . . . . .		27	27	27	18	10
ohne RK . . . . .		21	—	17	14	8
Kongenitale Vitien . .	12		—	6	1	1

RK = Rheumatische Knötchen. — EE = Endokard-Endothelzellen. — EB = Endokardiale Bindegewebszellen. — GE = Gefäß-Endothelzellen.

### Ergebnisse

Unter den 48 Herzohren von Mitralstenosen (s. Tabelle) konnten in 27 Herzohren Aschoffsche Knötchen nachgewiesen werden, die multipel im subendokardialen Bindegewebe und in 2 Herzohren auch vereinzelt im Interstitium des Myokards und im Epikard lagen. Die übrigen 21 Herzohren enthielten in den untersuchten Schnitten keine Aschoffschen Knötchen, was ihr Vorkommen in anderen Gewebsebenen nicht ausschließt. Die meisten Aschoffschen Knötchen waren sehr zellreich und entsprechen dem „Blutestadium“ nach KLINGE (1), andere verschiedenen Stadien der Vernarbung. *Alle Aschoffschen Knötchen hatten eine positive Fluoreszenz*, die strikt an die Zellen gebunden war und die sich durch ihre hellgrüne Leuchtkraft eindeutig von der Umgebung abhob (Abb. 1 u. 3). Die

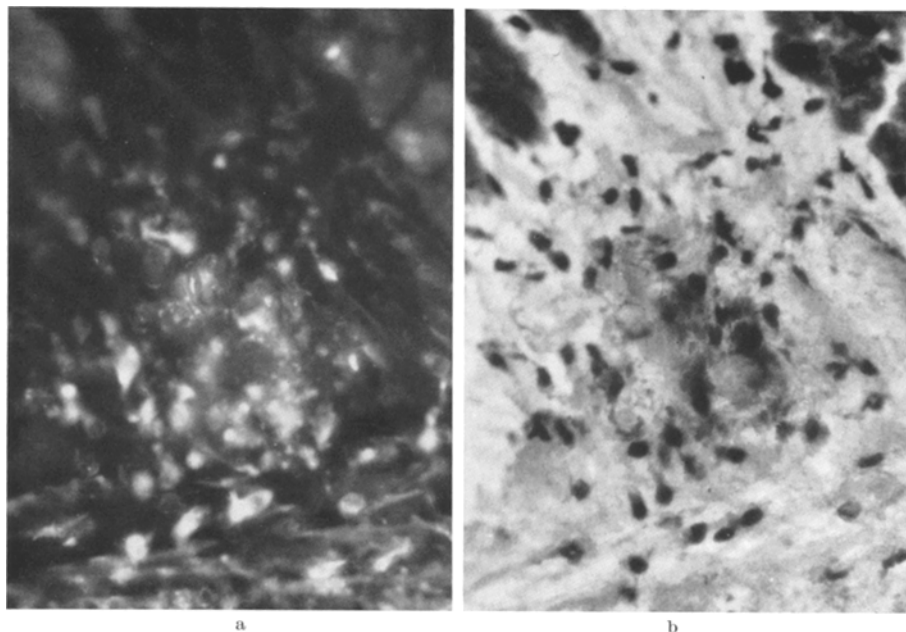


Abb. 1. Mit fluoresceingekoppeltem Antikomplement sichtbar gemachte komplementbindende Substanzen in den Zellen eines jungen Aschoffschen Knötchens (a); zum Vergleich derselbe Schnitt mit Hämalaun-Eosin nachgefärbt (b). Herzohr bei Mitralstenose (E. Nr. 8160/60); Vergr. 250fach

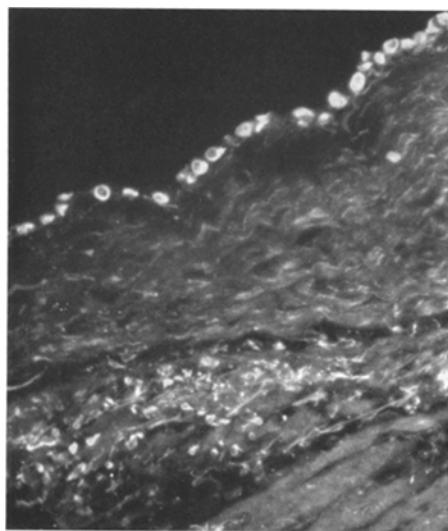


Abb. 2

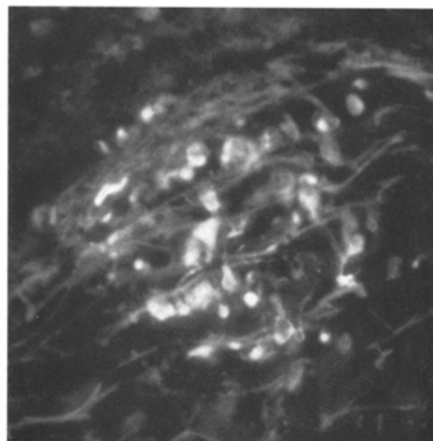


Abb. 3

Abb. 2. Fluoreszierende Endothelzellen mit ausgesparten Kernen und fluoreszierende Zellen eines Aschoffschen Knötchens in den tiefen Schichten des Endokards eines Herzohres bei Mitralstenose nach Behandlung mit Komplement und markiertem Antikomplement (E. Nr. 8160/60); Vergr. 120fach

Abb. 3. Typische Fluoreszenz der Zellen eines Aschoffschen Knötchens nach Behandlung mit Komplement und fluoresceinmarkiertem Antikomplement. Vergr. 250fach

Kerne der fluoreszierenden Zellen blieben deutlich ausgespart, und in den umgebenden Gewebsschnitten fehlte die kennzeichnende Fluoreszenz. Aschoffsche

Knötchen mit den Zeichen beginnender Vernarbung hatten eine deutlich abgeschwächte Fluoreszenz ihrer Zellen, wobei die Intensität der Fluoreszenz mit fortschreitender Vernarbung abnahm. In vollkommen narbig umgewandelten Aschoffschen Knötchen fehlte die charakteristische Fluoreszenz. In einem Herzohr zeichnete sich im perivaskulären Bindegewebe des Myokards eine umschriebene, aber diffuse Fluoreszenz von charakteristischer Farbe und Leuchtkraft deutlich ab, die bei der nachträglichen Überfärbung des Schnittes einer fibrinoiden Verquellung zugeordnet werden konnte.

In allen Herzohren mit Aschoffschen Knötchen fluorescierten sämtliche Endothelzellen des Endokards in charakteristischer Weise ebenso intensiv wie die Zellen der Aschoffschen Knötchen bei deutlicher Aussparung ihrer Kerne (Abb. 2). In zehn dieser Herzohren wurde dieselbe Fluoreszenz in den Endothelzellen kleiner Kranzschlagaderäste nachgewiesen, während sie in den Endothelzellen der Venen immer fehlte. Bei 18 Herzohren mit Aschoffschen Knötchen fluorescierten außerdem einzelne mesenchymale Zellen des subendokardialen Bindegewebes in charakteristischer Farbe und Intensität. In den untersuchten Schnitten fluorescierten in 17 Fällen von den 21 Herzohren bei Mitralstenosen ohne Aschoffsche Knötchen die Endothelzellen des Endokards in typischer Weise, die Endothelzellen der Kranzschlagaderäste zusätzlich in 14 Fällen und in 8 Fällen außerdem einzelne Zellen des subendokardialen Bindegewebes.

Bei den zwölf als Kontrollen verwendeten Herzohren von operierten kongenitalen Herzfehlern bestand in sechs Herzohren eine charakteristische Fluoreszenz der Endothelzellen des Endokards und in einem Herzohr zusätzlich eine Fluoreszenz der Endothelzellen der Herzkranzgefäße sowie einiger Zellen des subendokardialen Bindegewebes.

### Diskussion

In den fluoreszierenden Zellen der Aschoffschen Knötchen, des Endokards, manchmal des Gefäßendothels und des subendokardialen Bindegewebes sind Stoffe, die unter definierten Bedingungen mit antigen-wirksamen Bestandteilen des Meerschweinchenserums reagieren. Diese Bedingungen wurden am Modell der Masugi-Niere für die Reaktion zwischen Ag-Ak-Komplex und Komplement als charakteristisch aufgezeigt: Dabei bindet ein bekannter Ag-Ak-Komplex, nämlich das mit Nephrotoxin sensibilisierte Glomerulum, Material aus dem Meerschweinchenserum unter denselben Umständen, die für die durch Komplement bewirkte Immunnämolyse typisch sind. Deshalb muß das in den Zellen der untersuchten Herzohren fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemachte und aus dem Meerschweinchenserum stammende Material als Komplement angesehen werden. Es erhebt sich jedoch die Frage, ob die im Gewebe nachgewiesenen komplementbindenden Strukturen im strengen Sinne als Ag-Ak-Komplex anzusehen sind, oder ob sie Stoffe darstellen, die nur im Hinblick auf die Reaktionsfähigkeit mit Komplement die gleichen Eigenschaften besitzen wie ein Ag-Ak-Komplex.

In letzter Zeit haben MARCUS sowie ISHIZAKA u. ISHIZAKA im Hämolyseversuch festgestellt, daß gereinigtes  $\gamma$ -Globulin nach Adsorption an Bentonit oder nach Hitzedenaturierung Komplement inaktiviert. Das Verschwinden der lytischen Aktivität ähnelt in der Reihenfolge, in der die Komponenten betroffen werden, sowie in manchen kinetischen Charakteristika dem Komplementschwund, der bei der Einwirkung von Ag-Ak-Komplexen auf frisches Serum

zu beobachten ist. Es ist aber unbekannt, ob sich bei der Wechselwirkung zwischen  $\gamma$ -Globulin-Präparaten und Komplement ein fluoreszenzserologisch faßbares Material an dem  $\gamma$ -Globulin niederschlägt, wie dies bei den mit Komplement reagierenden Ag-Ak-Komplexen der Fall ist. Eine Reihe von Stoffen inaktiviert Komplement, ohne Komplement an das auslösende Agens zu binden; z.B. Stoffe, die das Plasminogen aktivieren (LEPOW u. Mitarb.). Nach DAVIS u. Mitarb. inaktiviert gereinigtes  $\gamma$ -Globulin nur dann Komplement, wenn es von den hemmenden  $\beta$ -Globulinen und den Albuminen abgesondert ist. Die Reaktionsfähigkeit des  $\gamma$ -Globulins gegenüber Komplement wird nach HEIDELBERGER wesentlich verstärkt, wenn die  $\gamma$ -Globulin-Moleküle dicht gepackt in Apposition liegen, wie es in den Versuchen durch Bentonit (MARCUS) oder Hitzedenaturierung (ISHIZAKA u. ISHIZAKA) erreicht wurde. Die Experimente von MARCUS und ISHIZAKA u. ISHIZAKA sind Bemühungen, ein Modell zum Verständnis für die Wirkungsweise von Ag-Ak-Komplexen zu finden. Mit den Bedingungen, die für das Funktionieren dieses Modells unerläßlich sind (Abtrennung von anderen Serumproteinen, Aggregation der Moleküle), kann aber in vivo nicht ohne weiteres gerechnet werden. Eine dem Modellversuch entsprechende Anreicherung von hochgradig reinem  $\gamma$ -Globulin an Gewebsstrukturen in vivo ist bis jetzt nur für die Bindung von Antikörpern an Antigene bekannt.

Man wird also vorläufig Substanzen in Zellen und Gewebsbezirken, die unter den angewandten methodischen Bedingungen und damit unter den charakteristischen Umständen Komplement binden, als Ag-Ak-Komplexe ansehen müssen; alle anderen Möglichkeiten sind für die Verhältnisse im menschlichen und tierischen Organismus zunächst nur Spekulation. Das schließt eine in Zukunft vielleicht notwendig werdende Unterscheidung zwischen Ag-Ak-Komplexen im engeren und komplementbindenden Aggregaten im weiteren Sinne nicht aus. Bis jetzt bestehen für eine solche Unterscheidung in der Immunhistologie kein Verfahren und kein durch Befunde gestützter Anlaß. Trotzdem wollen wir im folgenden an Stelle der Bezeichnung „Ag-Ak-Komplexe“ den weniger präjudizierenden Ausdruck „komplementbindende Substanzen“ oder „komplementbindende Aktivität“ sowie sinngemäße Ausdrücke verwenden.

Die in den Aschoffschen Knötchen fluoreszenzmikroskopisch dargestellte Fähigkeit zur Komplementbindung kann lokalisiert werden. Sie ist an die Zellen gebunden und schon in den Anfangsstadien der Proliferation nachzuweisen. Mit zunehmendem Zellgehalt wird die Fähigkeit zur Komplementbindung stärker. Sie erreicht ihr Maximum in dem voll entwickelten Aschoffschen Knötchen, um bei fortschreitender Vernarbung an Intensität abzunehmen bis zum vollkommenen Schwund in dem narbig umgewandelten rheumatischen Knötchen. Diese komplementbindenden Substanzen wurden nur einmal in einer fibrinoiden Nekrose festgestellt, was zwar für ihr Vorkommen im Frühstadium des rheumatischen Gewebsschadens spricht aber noch nicht belegt, daß sie ein konstantes Merkmal sind. Der fehlende Nachweis der komplementbindenden Aktivität — erkennbar an dem Ausbleiben der Fluoreszenz — bedeutet im Hinblick auf den Träger dieser Aktivität nicht unbedingt sein Nichtmehrexistieren. Es gibt Umstände (z.B. Antigenüberschuß), unter denen Ag-Ak-Komplexe ein Minimum an komplementbindender Potenz besitzen. Schließlich entgehen geringe Mengen komplementbindender Substanz dem fluoreszenzserologischen Nachweis, weil die Menge an gebundenem Komplement für eine sichtbare Bindung von markiertem Antikomplement nicht ausreicht.

In den Herzohren von Mitralstenosen fluorescieren alle Endothelzellen des Endokards mit gleicher Intensität wie die Zellen der rheumatischen Knötchen auch dann, wenn in den Schnitten Aschoffsche Knötchen fehlen. Ebenso fluores-

cieren manchmal die Endothelzellen kleiner Kranzschlagadern und Zellen des subendokardialen Bindegewebes in charakteristischer Weise. Somit läßt sich die komplementbindende Aktivität bei Mitralstenosen nicht nur an den Zellen der Aschoffschen Knötchen, deren Genese vom reticuloendothelialen System allgemein anerkannt ist, illustrieren, sondern auch an den Endothelzellen des Endokards und kleiner Kranzschlagaderäste. Das Endothel dieser Kreislaufprovinzen wird auf Grund experimenteller und histomorphologischer Untersuchungen von den meisten Autoren — mit Ausnahme von FOOT, McJUNKIN und TÖRÖ — nicht dem reticuloendothelialen System im Sinne ASCHOFFS zugeordnet (FRESÉN). Für die Verhaftung, Speicherung oder auch Bildung komplementbindender Substanzen wird man aber dem Endothel des Endokards und der Kranzgefäße eine aktive Beteiligung, wie sie sonst nur den Zellen des reticuloendothelialen Gewebes in der zur Zeit gültigen Definition zuerkannt wird, nicht mehr ganz absprechen können.

Der Verteilungsmodus der fluoreszierenden Zellen an der Strombahn mit obligatem Befall der Zellen des Endokard-Endothels, teilweise auch des Endothels der Coronararterienäste und einzelner Zellen des endokardialen Bindegewebes sowie das Fehlen komplementbindender Strukturen in den Endothelzellen der Venen, legen den Gedanken nahe, daß durch diese Zellen komplementbindende Stoffe aus dem strömenden Blut abgefangen werden.

Die charakteristische Fluoreszenz der Endothelzellen des Endokards bestand auch in der Hälfte der zur Kontrolle untersuchten Herzohren von kongenitalen Vitien, einmal gleichzeitig mit einer Fluoreszenz der Endothelzellen der Herzkranzarterienäste und Zellen des endokardialen Bindegewebes gekoppelt. Komplementbindende Stoffe kommen also im Endothel der Herzohren nicht nur beim chronischen Rheumatismus vor, sondern auch bei Bedingungen, die — wie im Falle der angeborenen Herzfehler — in keinem Zusammenhang mit einer zur Operationszeit nachweisbaren Erkrankung stehen. Es ist deshalb zu fragen, ob die mit der Untersuchungsmethode erfaßten komplementbindenden Strukturen in den Zellen der Aschoffschen Knötchen mit der Pathogenese des Rheumatismus unmittelbar zusammenhängen. Da fast alle Ag-Ak-Komplexe Komplement binden, können sich die in den rheumatischen Knötchen nachgewiesenen komplementbindenden Substanzen qualitativ von denen der Endothelzellen des Endokards und der Kranzschlagaderäste unterscheiden. Ein solcher Unterschied läßt sich aber mit der angewandten Methode nicht fassen. Außerdem besteht bei den Mitralstenosen für eine solche Annahme kein zwingender Grund, weil bei ihnen der Rheumatismus als einheitliche Grundkrankheit bewiesen ist. Auch weisen die immunhistochemischen Untersuchungen von TAYLER und SHEPERD an subcutanen Rheumaknötchen in diese Richtung. Bei den durch die Fluoreszenz erfaßten komplementbindenden Substanzen in den Herzohren der kongenitalen Vitien handelt es sich vermutlich um die Folge immunologischer Vorgänge nach Infekten verschiedener Ätiologie, die klinisch nicht in Erscheinung getreten sind. Diese Erklärung ist zu vertreten, wenn man bedenkt, daß sich der Organismus in ständiger Auseinandersetzung mit verschiedensten Umweltfaktoren, unter anderem auch mit antigenen Stoffen, befindet. Dabei werden temporär verschiedenartige Ag-Ak-Komplexe gebildet, ohne daß es zu klinischen Erscheinungen kommen muß. Bei den von uns untersuchten Fällen mit kongenitalen Vitien

haben wir wahrscheinlich eine solche Phase von vorhandenen immunologisch aktiven Substanzen in den Endothelzellen der Herzohren erfaßt.

Die durch Fluoreszenz indirekt nachgewiesenen komplementbindenden Substanzen sind an die Zellen gebunden. Ob sie *in* den Zellen liegen oder außen *an* den Zellen haften, ist vorläufig nicht zu entscheiden. Von der Fluoreszenz ausgesparte Kerne können sowohl bei Verhaftung der komplementbindenden Substanzen an der Zelloberfläche als auch bei Speicherung im Cytoplasma vorkommen. Das Auftreten der durch die Fluoreszenz dargestellten komplementbindenden Stoffe an oder in den Zellen kann einerseits als Aufnahme oder Anlagerung fertiger Ag-Ak-Komplexe gedeutet werden, andererseits als Bindung von Antikörpern an cellular verankerte Antigene oder von Antigenen an zellständige Antikörper.

Die angewandte immunhistologische Untersuchungsmethode ist ihrem Prinzip nach ein *Suchverfahren* für Ag-Ak-Komplexe, die Komplement binden. Für eine weitere qualitative Differenzierung der Ag-Ak-Komplexe ist die Erfassung des Antigens durch einen markierten spezifischen Antikörper notwendig. Deshalb kann bis jetzt nicht als bewiesen angesehen werden, daß die in den Aschoffschen Knötchen und den Endothelzellen der Herzohren von Mitralkstenosen nachgewiesenen komplementbindenden Substanzen spezifisch für den Rheumatismus wären, sondern wir können es nur vermuten, allerdings mit einem hohen Grad an Wahrscheinlichkeit.

### Zusammenfassung

Operativ entfernte Herzohren von Patienten mit Mitralkstenosen wurden auf komplementbindende Substanzen mit der fluoreszenzserologischen Methode nach KLEIN und BURKHOLDER untersucht. Als Kontrollen dienten operativ entfernte Herzohren von Fällen mit kongenitalen Vitien. Die Zellen der Aschoffschen Knötchen, die Endothelzellen des Endokards, manchmal auch die der Coronararterienäste und schließlich vereinzelte Zellen des endokardialen Bindegewebes binden Meerschweinchenkomplement in der gleichen Art wie Antigen-Antikörper-Komplexe. Auch in einigen Kontrollfällen konnte eine Komplementbindung in den Endothelzellen des Endokards nachgewiesen werden. Die fluoreszenzmikroskopisch dargestellten komplementbindenden Substanzen werden für Antigen-Antikörper-Komplexe gehalten. Sie sind in den Fällen von Mitralkstenose sehr wahrscheinlich für den Rheumatismus spezifisch, in den Fällen der kongenitalen Vitien vermutlich nur Folge immunologischer Vorgänge nach Infekten unterschiedlicher Ätiologie.

### Summary

Surgically removed auricular appendages from patients with mitral stenosis were investigated for complement fixing substances with the fluorescent-serological method of KLEIN and BURKHOLDER. Surgically removed auricular appendages of congenitally diseased hearts served as controls. The cells of the Aschoff nodules, the endothelial cells of the endocardium, at times the endothelial cells of the branches of the coronary arteries, and occasionally cells of the endocardial connective tissue bound guinea pig complement in the same way as do antigen-antibody complexes. In addition, in some of the controls a similar fixation of

complement could be demonstrated in the endothelial cells of the endocardium. The substances fixing the complement, as demonstrated with the fluorescent microscope, were regarded as antigen-antibody complexes. In the cases of mitral stenosis they were most probably specific for rheumatic fever; in the cases of congenital heart disease they presumably were only the result of immunological processes following infections of various etiologies.

### Literatur

- ASCHOFF, L.: Zur Myocarditisfrage. Verh. dtsch. path. Ges. 8, 46—51 (1904).
- COBURN, A. F., and D. C. YOUNG: The epidemiology of hemolytic streptococcus during World War II in the United States Navy. Williams und Wilkins; Baillière, Tindall and Cox. 1949.
- COONS, A. H., and M. H. KAPLAN: Lokalization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. exp. Med. 91, 1—13 (1950).
- CRAMER, H., u. E. LANGER: Zur mikroskopischen Darstellung komplementbindender Antigen-Antikörperkomplexe mit fluoresceinmarkiertem Antikomplement. Histochemie 2, 176—185 (1961).
- DAVIS, B. D., E. KABAT, A. D. HARRIS and D. H. MOORE: Antikomplementary activity of serum gamma Globulin. J. Immunol. 49, 223—233 (1944).
- FOOT, N. CH.: Chemical contrasts between collagenous and reticular connective tissue. Amer. J. Path. 4, 525—544 (1928).
- FRESEN, O.: Das retotheliale System, seine physiologische Bedeutung, morphologische Bestimmung und Stellung in der Hämatologie. In Handbuch der gesamten Haematologie, Bd. I, S. 489—544. München-Berlin-Wien: Urban & Schwarzenberg 1957.
- GEIPEL, P.: Untersuchungen über rheumatische Myokarditis. Dtsch. Arch. klin. Med. 85, 75—88 (1906).
- 20. Sitzg vom 9. März 1907 der Ges. für Natur- und Heilkunde zu Dresden. Münch. med. Wschr. 1907, 1057—1058.
- HEIDELBERGER, M., A. J. WEIL and H. D. TREFFENS: Quantitative chemical studies on complement or alexin. II. The interrelation of complement with antigen-antibody compounds and with sensitized red cells. J. exp. Med. 73, 695—709 (1941).
- ISHIZAKA, T., and K. ISHIZAKA: Biological activities of aggregated gamma-globulin I. Skin reactive and complement-fixing of heat denaturated gamma-globulin. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 101, 845—850 (1959).
- KAPLAN, M. H., and F. D. DALLENBACH: Immunologic studies of heart tissue. III. Occurrence of bound gamma-globulin in auricular appendages from rheumatic hearts. Relationship to certain histopathologic features of rheumatic heart disease. J. exp. Med. 113, 1—16 (1961).
- KLEIN, P., u. P. BURKHOLDER: Ein Verfahren zur fluoreszenzoptischen Darstellung der Komplementbindung und seine Anwendung zur histo-immunologischen Untersuchung der experimentellen Nierenanaphylaxe. Dtsch. med. Wschr. 84, 2001—2004 (1959).
- KLINGE, F.: (1) Die Eiweißüberempfindlichkeit (Gewebsanaphylaxie) der Gelenke. Experimentelle pathologisch-anatomische Studie zur Pathogenese des Gelenkrheumatismus. Beitr. path. Anat. 83, 185—216 (1929).
- (2) Das Gewebsbild des fieberhaften Rheumatismus. II. Mitt. Das subakut-chronische Stadium des Zellknötchens. Virchows Arch. path. Anat. 279, 1—16 (1931).
- (3) Das Gewebsbild des fieberhaften Rheumatismus. III. Mitt. Narbe und Rezidiv. Virchows Arch. path. Anat. 279, 16—30 (1931).
- LANCEFIELD, R. C.: Antigenic relationship of the nucleoproteins from the gram-positive cocci. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 27, 109 (1924).
- LEPOW, I. H., and L. PILLEMER: Studies on the mechanism of inactivation of human complement by plasmin and by Antigen-Antibody aggregates; demonstration of two distinct reaction stages in complement fixation. II. Demonstration of two distinct reactive stages in complement fixation. J. Immunol. 75, 63—70 (1955).

- MARCUS, J., and M. DONALD: A study of the mechanism of the anticomplementary activity of gamma-globulin. *J. Immunol.* **84**, 273—283 (1960).
- McJUNKIN, F. A.: Origin of phagocytic mononuclear cells in the peripheral blood. *Amer. J. Anat.* **25**, 27—53 (1919).
- OBERMAYR, K., u. W. PICK: Über die chemischen Grundlagen der Arteigenschaften der Eiweißkörper. *Wien. klin. Wschr.* **19**, 327—329 (1906).
- RÖSSLE, R.: Referat über die Entzündung. *Verh. dtsh. path. Ges.* **19**, 18—68 (1923).
- Zum Formenkreis der rheumatischen Gewebsveränderungen mit besonderer Berücksichtigung der rheumatischen Gefäßentzündung. *Virchows Arch. path Anat.* **288**, 574—581 (1933).
- Die nosologische Stellung des Rheumatismus. *Klin. Wschr.* (1936), 809—814.
- Allergie und Pathergie. *Klin. Wschr.* (1938), 574—581.
- SWIFT, H. F.: The etiology of rheumatic fever. *Ann. intern. Med.* **31**, 715—738 (1949).
- TAYLER, H. E., and W. E. SHEPERD: The immunohistochemical interaction of autologous rheumatoid serum with subcutaneous rheumatoid nodules. *Lab. Invest.* **9**, 603—612 (1960).
- TÖRÖ, I.: Histologische Untersuchungen über die Beziehung zwischen retikuloendotheliale System und Histaminwirkung. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **52**, 552—554 (1942).
- VASQUEZ, J. J., and F. J. DIXON: Immunohistochemical study of lesions in rheumatic fever, systemic lupus erythematosus, and rheumatoid arthritis. *Lab. Invest.* **6**, 205—217 (1957).

Professor Dr. ERICH LANGER  
Pathologisches Institut der Medizinischen Akademie  
Düsseldorf, Moorenstraße 5

Professor Dr. PAUL KLEIN  
Institut für Med. Mikrobiologie, Mainz, Langenbeckstraße 1